死亡素与泛素在大肠杆菌中的高效融合表达

金丰良，张呈文，许小霞，孙 强，任顺祥*
（华南农业大学资源环境学院昆虫学系/教育部生物防治工程研究中心，广州 510642）

摘要：死亡素是由 21 个氨基酸残基组成的广谱抗菌肽。为了高效表达可溶性的死亡素，本研究利用递归式 PCR (recursive PCR, rPCR)扩增了死亡素基因 *thanatin*，并将其和家蝇 *Musca domestica* 泛素基因 *ubiquitin* 构成嵌合基因，克隆到表达载体 pET-32a，再与硫氧还蛋白融合后构建表达载体 pET-TRX-UBI-THA。将酶切和测序鉴定正确的质粒转化表达宿主菌 BL21，经 0.6 mmol/L IPTG 诱导，TRX-UBI-THA 融合蛋白得到了高效可溶性表达。SDS-PAGE 和 Western blot 检测结果表明融合蛋白的分子量为 28.9 kD，与预期的结果一致，表达量占菌体总蛋白的 46%。Western blot 分析结果显示融合蛋白能与 Ni-NTA 鳌合物特异性的结合，表明在融合蛋白的 N-端带有 6×His 标签。利用 C-端带有 6×His 标签的泛素 C-端水解酶对融合蛋白进行切割，切割产物经 Ni^{2+}-NTA 亲和柱和 HPLC 纯化（纯化量为 5.4 mg/L），Tricince-SDS-PAGE 电泳得到单一的泛素蛋白条带。电喷雾质谱(ESI-MS)分析表明，纯化的泛素分子量为 2.57 kD，与通过氨基酸预测的分子量完全一致。利用琼脂孔穴扩散法对泛素活性进行检测，结果显示纯化的泛素对大肠杆菌 $K_{12}D_{31}$ 和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 具有较强的活性抑制。本研究表明，利用泛素融合技术可以高效表达可溶性的死亡素。

关键词：抗菌肽；死亡素；泛素；融合表达；纯化；活性检测
中图分类号：Q78;S43 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2009)05-0495-07

High-level fusion expression of thanatin with an ubiqutin fusion partner in *Escherichia coli*

JIN Feng-Liang, ZHANG Cheng-Wen, XU Xiao-Xia, SUN Qiang, REN Shun-Xiang* (College of Natural Resources and Environments, South China Agricultural University/Engineering Research Centre of Biological Control, Ministry of Education, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Thanatin is one of the antibacterial peptides which consists of 21 amino acids and has a broad spectrum of antimicrobial activities. To explore a cost-effective approach for high-level expression of the thanatin in *Escherichia coli*, the cDNA fragment encoding thanatin with preferred codons of *E. coli* was obtained by recursive PCR (rPCR) and fused to the C-terminal of ubiquitin (UBI) from housefly, *Musca domestica*. The fused gene was inserted into the plasmid pET32a to construct the expression vector pET-TRX-UBI-THA and express the fusion protein with 6×His tag in *E. coli* BL21. The fusion protein was expressed in soluble form under the optimized conditions at a high-level (more than 46% of the total proteins). With 6×His tag, the proteins were easily purified by Ni^{2+}-NTA chromatography. The purified proteins were efficiently cleaved by ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase which linked with 6×His tag at the carboxyl-terminus (UCH-6×His), yielding recombinant thanatin with significant antimicrobial activity. After contaminants removal by Ni^{2+}-NTA chromatography, recombinant thanatin was purified by reversed phase HPLC, 5.4 mg of pure active thanatin was obtained from 1 L culture medium. ESI-MS analysis showed that the molecular weight of the purified recombinant thanatin was 2.57 kD, which perfectly matched the mass calculated from the amino acid sequence. The antimicrobial assay showed that the purified thanatin has high activities against *E. coli* $K_{12}D_{31}$ and *Staphylococcus aureus*. Our results demonstrated that functional thanatin can be produced in sufficient quantity using the ubiquitin fusion technique at a low cost.

基金项目：国家重点基础研究发展规划（"973"计划）项目(2006CB102005)；国家青年科学基金项目(30800718)；公益性行业科研专项经费(200803005)

作者简介：金丰良，男，1975 年生，山东青州人，副研究员，主要从事昆虫免疫工作，E-mail：jflbang@yahoo.com.cn
*通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 020-85283508; Fax: 020-85280292; E-mail: rensxcn@yahoo.com.cn

收稿日期 Received：2008-12-05；接受日期 Accepted：2009-03-20

Key words: Antibacterial peptides; thanatin; ubiqutin; fusion expression; purification; bioassay

抗微生物肽(antimicrobial peptides, AMPs)是动物体内与免疫相关的小分子多肽,在保护宿主防止外源微生物的侵染过程中起着关键的作用(Boman, 1991, 1995)。抗微生物肽对侵染宿主的病原微生物具有高效、广谱的抑制作用,而对宿主无任何毒副作用,因此抗微生物肽作为新型安全的肽类抗生素和生物防治制剂有望应用于医疗和农业中(Lehrer *et al*., 1993)。但抗菌肽在生物组织中含量少,分离获得大量天然产物困难很大,人工合成则成本高。基因工程是一个较为理想的选择,但是由于抗菌肽分子小,容易被蛋白酶降解,同时由于其表达产物对原核宿主菌有害,因此不能在原核系统中直接表达,一般采用融合表达或在真核系统中表达(Anderson *et al*., 1991; Aly *et al*., 1999; 陈海旭等, 2001, 2002; Cabral *et al*., 2003; Jin *et al*., 2006a, 2006b; 金丰良等, 2006; 汪小福等, 2007; Wu *et al*., 2008)。

泛素(ubiquitin)是分子伴侣家族中的一员,可以起到增加翻译水平和稳定蛋白的作用(Baker, 1996; Butt *et al*., 2005; Assadi-Porter *et al*., 2008)。泛素特异性蛋白酶(ubiquitin-specific processing proteases, UBPs)广泛存在于酵母等真核生物,可以有效地酶解泛素融合蛋白,与其他用于酶解融合蛋白的特异性蛋白酶如FactorX和Thrombin相比,UBPs具有更高的酶活力和更强的特异性。自从Baker等(1996)证明利用泛素融合的方法可以将异源基因在酵母中的表达提高几百倍后,这项"泛素融合技术(ubiquitin fusion technique)"已开始应用于多种外源基因的表达和转基因植物的研究领域中。近年来的研究发现,将外源基因与泛素基因融合后,不仅可以防止表达产物被降解,极大地提高外源基因的表达量,而且表达的融合蛋白在离体或体内条件下,经泛素特异性蛋白酶在泛素分子C-末端切割后,可以释放出完整而有活性的外源蛋白(Gellissen, 2000;孙超等, 2001; Xu *et al*., 2007)。

死亡素是近来发现抗菌谱最广的抗菌肽,它不仅对革兰氏阳性、革兰氏阴性菌有抗性,而且对真菌也有杀灭活性,其作用方式可能是阻断细胞膜上的呼吸链,其广谱的杀菌活性,独特的杀菌机制预示其有广阔的应用前景(Bulet *et al*., 1991, 1999, 2004; Fehlhaum *et al*., 1996; Wu *et al*., 2008)。为了获得大量具有活性的死亡素,本研究利用泛素作为分子伴侣,对死亡素在原核细胞中的可溶性融合表达、纯化和活性鉴定进行了研究。

1 材料与方法

1.1 试虫、菌株与质粒

家蝇 *Musca domestica* 幼虫由本实验室养虫室提供,为人工饲料饲养的健康幼虫。大肠杆菌 *Escherichia coli* Top10、pET-32a表达载体及表达宿主菌BL21为本实验室保存; pMD18-T载体购自TaKaRa公司。

1.2 主要试剂

RNA抽提Trizol试剂盒及反转录试剂盒购自Invitrogen公司,各种限制性内切酶和 T_4DNA连接酶购自Promega公司,ExTaq DNA聚合酶、核酸分子量标准、蛋白分子量标准及各种抗生素购自TaKaRa公司,Ni^{2+}-NTA亲和纯化柱购自Qiagen生物公司,C-端带有6×His标签的泛素C-端水解酶(ubiquitin C-terminal hydrolase, UCH)(UCH-6×His)购自美国Biomel公司。

1.3 死亡素基因与家蝇泛素融合基因的克隆

根据 *thanatin* 的氨基酸序列 GSKKPVPIIYCNRRTGKCQRM 和大肠杆菌偏爱密码子,合成两段特异性核苷酸片段,两片段有22个碱基互补,THAF: 5′-ATGTGGCATGGGTTCCAAGAAGCCAGTGCCAATCATCTACTGCAACAG-3′,THAR: 5′-CC AAGCTTCTACATCCTCTGGCACTTACCAGTCCTCCTGTTGCAGTAGATGATTGGCA-3′(*Hin*d Ⅲ),并使其带上起始密码子ATG。利用THAF和THAR互为引物互为模板进行PCR扩增,PCR反应程序为: 94℃,30 s;55℃,30 s;72℃,40 s;30个循环,72℃延伸7 min。根据家蝇泛素ORF的核苷酸序列设计引物,UBIF: 5′-ACGGATCCATGCAGATTTTCGTGAAAACC-3′(*Bam*H Ⅰ);UBIR: 5′-GCCACCGCGCAGGCGAAGGACC-3′,RT-PCR扩增家蝇泛素ORF。根据家蝇 *ubiquitin* 和 *thanatin* 的核苷酸序列合成融合片段UBI-THA: 5′-TGCATTTGGTCCTTCGCCTGCGCGGTGGCATGTGGCATGGGTTCCAAGAAGCCAGTG-3′,为了便于 *ubiquitin* 和 *thanatin* 融合基因的克隆,分别在UBIF和THAR两端带上酶切位点 *Bam*H Ⅰ和 *Hin*d Ⅲ。将 *ubiquitin* 和 *thanatin* 的PCR产物及UBI-THA混合后,用UBIF和THAR为引物扩增家蝇 *ubiquitin* 和 *thanatin* 的融合基因,PCR反应程序为:94℃,

7 min;94℃,30 s;55℃,30 s;72℃,40 s;30 个循环,72℃延伸 7 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳纯化后,连入 pMD18-T 载体,连接产物转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞,蓝白斑筛选阳性转化子,将 *Bam*H Ⅰ和 *Hin*d Ⅲ双酶切鉴定正确的转化子送上海英骏生物技术有限公司测序。融合基因泛素-死亡素(*UBI-THA*)克隆过程如图 1 所示。

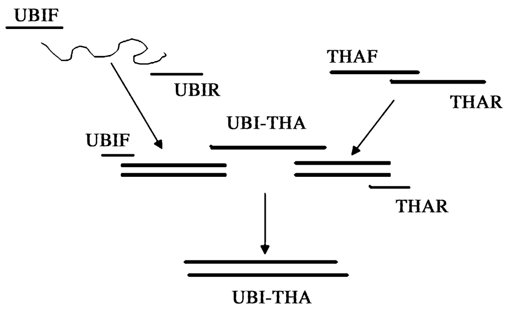


图 1　死亡素与泛素基因融合的克隆过程

Fig. 1　The construction of fused gene including thanatin and ubiquitin gene

1.4　死亡素与家蝇泛素融合基因在原核细胞中的表达和纯化

用 *Bam*H Ⅰ/*Hin*d Ⅲ双酶切测序正确的重组质粒。琼脂糖凝胶电泳回收纯化目的片段,与经 *Bam*H Ⅰ/*Hin*d Ⅲ同样双酶切的 pET-32a 载体连接,构建重组表达载体 pET-TRX-UBI-THA,并转化入 BL21 (DE3)大肠杆菌感受态细胞中,挑取酶切和测序鉴定正确的单克隆于10 mL LB 培养基 (含 100 μg/mL 氨苄青霉素) 中 37℃过夜, 次日用新鲜的 LB 培养基以 1∶100 稀释后继续 37℃ 培养, 当 A_{600} 达到 0. 6 后加入终浓度为 0.6 mmol/L的 IPTG,诱导目的蛋白的表达。30℃培养 6 h 后, 4℃,12 000 r/min 离心 1 min,收集菌体,并用裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8. 0, 50 mmol/L NaCl, 0.5% Triton X-100, 2 mg/mL 溶菌酶)裂解细胞沉淀,经超声及高速离心后, 上清液经过 Ni^{2+}-NTA 柱 (Qiagen)分离和纯化融合蛋白,经透析、冷冻干燥并最终溶解于 PBS (pH 7.4)使其终浓度为 1 mg/mL。

1.5　SDS-PAGE 电泳及 Western blot 分析

SDS-PAGE 电泳和 Western blot 分析参照文献(Sambrook *et al.*, 1989)进行。SDS-PAGE 电泳结束后,电转移至硝酸纤维素(NC)膜(Amersham,Φ = 0.22 μm)。用封闭液(PBST + 5% 脱脂奶粉)封闭 2 h,接着与一抗(用 PBST 按 1∶500 的比例稀释)室温反应 1 h,用 PBST 洗膜 3 次;然后加入 PBST 稀释的羊抗兔-IgG-AP(1∶500),室温反应 1 h,用 PBST 洗膜 3 次;最后将 NC 膜置于含有 NBT 和 BCIP 的显色液中显色至条带清晰,将膜放入蒸馏水中漂洗终止显色反应,取出晾干,拍照。

1.6　融合蛋白的切割及死亡素的纯化

用过滤灭菌的 HEPES 将 UCH-6 × His 稀释成 100 倍,按 1∶50 体积比分别与纯化后的融合蛋白混合于酶切缓冲液(50 mmol/L HEPES/NaOH, pH 7.8, 0. 5 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 0.1 mg/mL ovalbumin)中,使 6 × His-UCH 终浓度为 1∶5 000。置于 25℃,酶切 16 h,每隔 1 h 取出 10 μL 样品保存于 - 20℃,用 Tricine-SDS-PAGE 电泳检测酶切效率。酶切产物先用 Ni^{2+}-NTA 亲和柱进行纯化,收集流出液,流出液再进行第二次 Ni^{2+}-NTA 亲和柱纯化,收集流出液,进一步用截留分子量为 10.0 kD的超率装置(amicon)对重组蛋白进行纯化,除去 10.0 kD 以上的大蛋白。将纯化后的重组蛋白用半制备型 RP-HPLC(reversed phase HPLC)的 C18 (250 mm × 4. 6 mm, 5 μm 300 Å)进行分析。用 0.1% TFA 和 18% 乙腈进行预平衡,用线性梯度的乙腈(18% ~45%, v/v)和 0.1% TFA 在 1.35% 每分钟洗脱目的蛋白,流速保持 1.0 mL/min。收集洗脱峰,分别进行活性测定和 Tricine-SDS-PAGE 电泳(Sambrook *et al.*, 1989)分析。将重组蛋白进行冷冻干燥, - 80℃保存备用。电喷雾质谱(ESI-MS)进行死亡素纯度和分子量分析。

1.7　重组蛋白死亡素的生物活性检测

采用琼脂孔穴平板扩散法(Hultmark *et al.*, 1980),以革兰氏阴性菌 *E. coli* $K_{12}D_{31}$和革兰氏阳性菌 *S. aureus* 为指示菌,进行重组蛋白的抑菌活性检测。具体操作如下:挑取 *S. aureus* 和 *E. coli* $K_{12}D_{31}$,单菌落接种于 2 mL LB 液体培养基中,37℃ 250 r/min过夜培养,取适量培养物与 55℃ LB 半固体培养基充分混匀到(φ = 9 cm)平板,待平板充分凝固后用 0.5 mm 打孔器打孔,每个点样孔加重组蛋白 10 μL,以 ddH_2O 为空白对照,37℃过夜培养,测量抑菌圈直径大小,设置 3 组,每组设置 4 个重复。

2　结果

2.1　死亡素与家蝇泛素融合基因的克隆

THAF 和 THAR 互为引物互为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶检测表明在 70 bp左右有一亮带,与预期大小一致(图 2:A)。RT-PCR 扩增了家蝇泛素基因的 ORF,将测序正确

的死亡素基因 *Thanatin* 和家蝇泛素基因 *Ubiquitin* 的 PCR 产物混合后，经 PCR 扩增，1% 的琼脂糖电泳分析表明，获得大小为 300 bp 的条带，与预期的大小一致（图 2：B）。回收该片段，将其与克隆载体 pMD18-T 连接，经蓝白斑筛选。测序结果表明，融合基因符合 *UBI-THA* 编码。

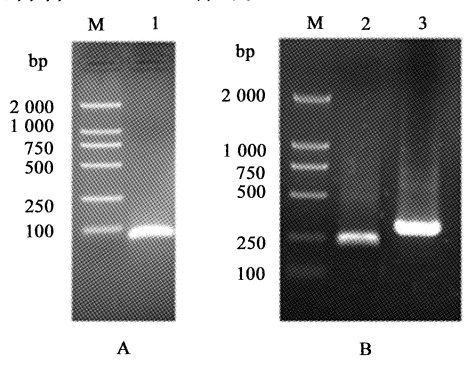


图 2 死亡素基因、泛素基因以及死亡素与泛素融合基因的 PCR 结果

Fig. 2 PCR results of *thanatin*, *ubiquitin* and their fusion gene

M：DNA 标准分子量 DL2000 marker；1：死亡素基因 *Thanatin*；2：泛素基因 *Ubiquitin*；3：死亡素与泛素融合基因 *UBI-THA*.

2.2 死亡素与家蝇泛素融合基因在原核细胞中的表达和纯化

将测序鉴定正确的表达质粒 pET-TRX-UBI-THA 转化大肠杆菌 BL21（DE3），经浓度为 0.6 mmol/L的 IPTG 诱导，SDS-PAGE 分析表明，含有 pET-TRX-UBI-THA 的细菌在 IPTG 诱导下表达了一条大约 29.0 kD 的蛋白条带，与预期的大小一致（图 3：A），经 CN-UV/WL Image-Formation System 的 Bioplot 软件对目的蛋白进行分析，融合蛋白表达量占菌体总蛋白的 46%，其中 90% 以上的融合蛋白为可溶性蛋白。Western blot 结果显示，所表达的融合蛋白能与家蝇泛素抗血清特异性的结合，表明所表达的融合蛋白含有泛素蛋白（图 3：B）。用识别融合蛋白质中组氨酸接头的 Ni^{2+}-NTA 偶联抗体检测也显示在预期大小处有阳性反应带出现，表明所表达的蛋白 N 末端带有 6 × His 的融合蛋白。以 6 × His-tag 纯化试剂盒一步纯化了 N 末端带有 6 × His-tag 的融合蛋白，SDS-PAGE 和 Western-blot（图 4）显示纯化的蛋白为单一纯净的条带。

2.3 融合蛋白的切割及死亡素的纯化

纯化的抗菌肽融合蛋白 6 × His-TRX-UBI-THA 在 25℃ 下，经 UCH-6 × His 酶切 16 h，酶切产物经 ddH_2O 透析后，进行 18% Tricine-SDS-PAGE 电泳分析。结果如图 5 所示，在约为 29 和 26 kD 处分别有两条亮带，在 2.5 kD 左右有一模糊条带，表明带有 6 × His 标签的重组 UCH 能够特异的识别泛素 C-末端的蛋白，并能够进行切割。用 HisTrap HP 柱对酶切混合物进行两次纯化，除去带有 6 × His 的分子伴侣、未切割的融合蛋白和 6 × His-UCH，获得单一的死亡素蛋白。纯化的死亡素经 ESI-MS 进行分析，$[\text{thanatin} + 4H^+]^{4+}$ 和 $[\text{thanatin} + 6H^+]^{6+}$ 分子大小显示分别为 646 D 和 428 D，表明死亡素的分子量为 2.56 kD，与通过氨基酸序列推测的分子量相一致。重组死亡素的质谱结果为单一的峰，说明成分均一，为纯净的死亡素。

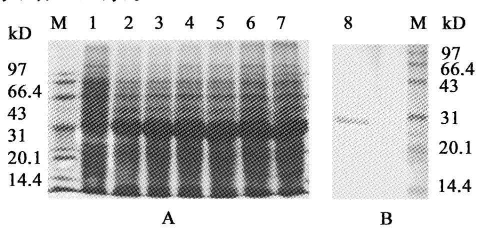


图 3 死亡素与家蝇泛素融合基因在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 电泳（A）和 Western-blot（B）分析

Fig. 3 SDS-PAGE (A) and Western-blot (B) analysis of 6 × His-TRX-UBI-THA expressed in *Escherichia coli* BL21

M：标准分子量 Protein standard molecular weight marker；1：为未诱导的对照菌株 Pellet of lysate of expressed bacteria before IPTG was induced；2，3，4，5，6，7：分别为用 0.6 mmol/L IPTG 诱导后培养 1，2，3，4，5 和 6 h 的菌株 Pellet of lysate of expressed bacteria after IPTG had been induced for 1 – 6 h.

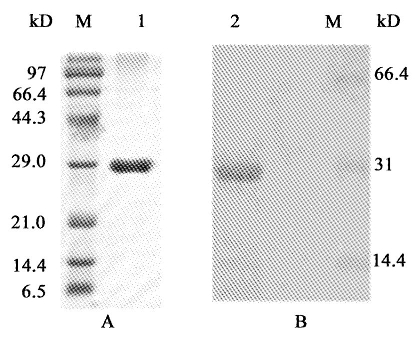


图 4 纯化的死亡素与家蝇泛素融合蛋白的 SDS-PAGE 电泳（A）和 Western-blot（B）分析

Fig. 4 SDS-PAGE (A) and Western-blot (B) analysis of purified fusion proteins of 6 × His-TRX-UBI-THA

M：标准分子量 Protein standard molecular weight marker；1：纯化的死亡素与家蝇泛素融合蛋白 SDS-PAGE 电泳 SDS-PAGE electrophoresis of purified fusion proteins of 6 × His-TRX-UBI-THA；2：Ni^{2+}-NTA 聚合物检测纯化的死亡素与家蝇泛素融合蛋白 Western-blot analysis of purified fusion proteins of 6 × His-TRX-UBI-THA using Ni^{2+}-NTA conjugate.

2.4 重组蛋白死亡素的生物活性测定

重组蛋白死亡素的冻干粉用灭菌 ddH_2O 溶解成 1 μg/mL 的溶液，以 *E. coli* $K_{12}D_{31}$ 和 *S. aureus* 为

指示菌,采用琼脂孔穴平板扩散法测定表达产物抑菌活性。结果如图 6 所示,经酶切纯化的死亡素对 *E. coli* $K_{12}D_{31}$ 和 *S. aureus* 有很强的抑菌活性,抑菌圈直径分别为 1.0 ±0.12 cm 和 1.0 ±0.14 cm。

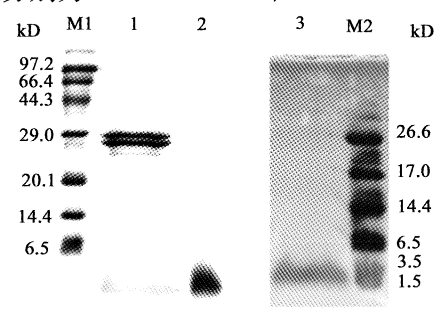


图 5　融合蛋白酶切后和纯化后的重组蛋白的 Tricine-SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 5　Tricine-SDS-PAGE analysis of the cleavage products from the 6 × His-TRX-UBI-THA fusion protein by 6 × His-UCH and Tricine-SDS-PAGE analysis of the purified recombinant thanatin

M1, M2: 标准分子量 Polypeptide SDS-PAGE molecular weight marker; 1: 融合蛋白酶切 16 h Cleavage products from the 6 × His-TRX-UBI-THA fusion protein by 6 × His -UCH for 16 h at 25℃; 2 –3: 纯化后的重组蛋白死亡素 Purified recombinant thanatin.

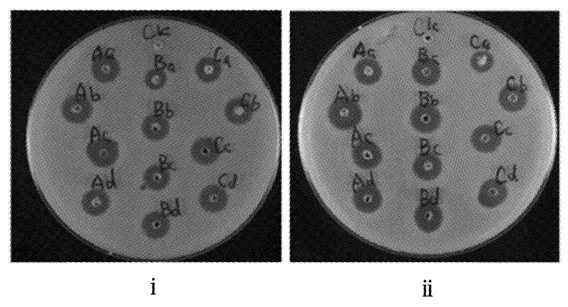


图 6　纯化重组死亡素对大肠杆菌 $K_{12}D_{31}$(ⅰ)和金黄色葡萄球菌(ⅱ)的活性检测

Fig. 6　Analysis of the activity of purified recombinant thanatin against *Escherichia coli* $K_{12}D_{31}$ (ⅰ) and *Staphylococcus aureus* (ⅱ)

CK: ddH_2O; A, B, C: 不同处理组 Different treatment groups; a, b, c, d: 每组内的 4 个重复 Four repeats within each treatment group.

3　讨论

死亡素是在昆虫斑腹刺益蝽 *Podisus maculiventris* 中发现的,由 21 个氨基酸残基组成的广谱抗菌肽,对革兰阳性、阴性菌以及某些真菌均有抑制作用,而且对一些临床上的耐药菌也有良好的抗菌活性。迄今为止死亡素在所有已知昆虫抗菌肽中是抗菌谱最广、抗菌活性最强的抗菌蛋白,其最小抑菌浓度低于 2.5 μmol/L(Fehlhaum *et al.*, 1996)。在抗生素副作用日益出现的今天,预示死亡素具有广阔的应用前景。近几年来,国内外对死亡素基因的研究多有报道。研究中发现,大部分的死亡素融合蛋白多呈包涵体的形式存在,增加了抗菌肽死亡素的纯化难度,而且融合蛋白在外源蛋白酶切割时,外源蛋白酶的使用引入了其他杂蛋白,使抗菌肽死亡素的纯化变得困难且不经济(翁宏飚等, 2002, 2003;钱坤等, 2005;文良柱等, 2006;Sang *et al.*, 2007)。为探讨一种表达高效、简易纯化的抗菌肽表达模式,为抗菌肽的生产提供一种经济实惠的分子平台,本研究利用原核表达载体 pET32a 为模板,根据 *thanatin* 的氨基酸序列和细菌偏爱的密码子合成 *thanatin* 的特异性引物,利用 PCR 获得了 *thanatin* 基因,构建了以硫氧还蛋白和泛素为双分子伴侣的表达载体,并在原核细胞中得到融合表达。表达的融合蛋白占总蛋白的 46% 以上,90% 以上的蛋白为可溶性蛋白。表达的融合蛋白带有载体特有的 6 × His 标签,简化了纯化步骤。纯化的融合蛋白在重组的泛素水解酶的作用下,释放出了具有高效杀菌活性的死亡素,本研究为死亡素的高效表达和快速纯化奠定了基础。

将抗菌肽和分子伴侣在细菌中融合表达,分子伴侣不仅降低了抗菌肽对宿主菌的毒性,而且保护了抗菌肽不被蛋白酶所降解。融合蛋白在外源蛋白酶切割时,往往出现切割不完全或增加了抗菌肽 N 端多余的氨基酸这些都降低了抗菌肽的产量和活性(Cabral *et al.*, 2003)。本研究曾经将合成的 *thanatin* 直接连接在表达载体 pET32a 的硫氧还蛋白下游,但没有得到很好的结果,推测表达的死亡素对宿主菌有毒性所致。在死亡素前连接泛素后,融合蛋白得到了高效表达,且 90% 以上的融合蛋白为可溶性蛋白,表明泛素分子伴侣不仅提高了下游死亡素的表达量,而且提高了其可溶性。融合蛋白经泛素 C-末端水解酶切割后,释放出具有杀菌活性的死亡素,纯化的死亡素经 ESI-MS 分析,其分子量为 2.56 kD,与通过氨基酸序列计算得到的分子量完全符合。表明泛素 C-末端水解酶可以正确识别泛素 C-末端的死亡素并进行切割,释放出具有天然 N 端的死亡素。

经济、简易快速纯化目的蛋白是基因工程必须的。本研究在构建泛素融合表达载体,充分考虑了下游的纯化工作,使融合蛋白的 N 端及泛素水解酶的 C 端带有 6 × His 标签。利用镍螯和亲和层析,既便于融合蛋白的纯化,也便利了融合蛋白被泛素水解酶切割后,目的蛋白中污染蛋白的去除,便于目的蛋白的快速纯化。

参 考 文 献(References)

Aly R, Granot D, Mahler-Slasky Y, Halpern N, Nir D, Galun E, 1999. *Saccharomyces cerevisiae* cells harboring the gene encoding sarcotoxin IA secrete a peptide that is toxic to plant pathogenic bacteria. *Protein Expr. Purif.*, 16: 120 - 124.

Anderson D, Sugstron A, Jasephson S, 1991. Biologically active amidated cecropin produced in a baculovirus expression system from a fusion containing the antibody binding part of protein A. *J. Biol. Chem.*, 28: 219 - 224.

Assadi-Porter MF, Patry S, Markley JL, 2008. Efficient and rapid protein expression and purification of small high disulfide containing sweet protein brazzein in *E. coli*. *Protein Expr. Purif.*, 58: 263 - 268.

Baker RT, 1996. Protein expression using ubiquitin fusion and cleavage. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 7: 541 - 546.

Boman HG, 1991. Antibacterial peptides: Key components needed in immunity. *Cell*, 65: 205 - 207.

Boman HG, 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Ann. Rev. Immunol.*, 13: 61 - 92.

Bulet P, Cociancich S, Dimarcq JL, Lambert J, Reichhart JM, Hoffmann D, Hetru C, Hoffmann JA, 1991. Insect Immunity: Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family. *J. Biol. Chem.*, 266(36): 24 520 - 24 525.

Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D, 1999. Antimicrobial peptides in insects: Structure and function. *Dev. Comp. Immunol.*, 23: 329 - 344.

Bulet P, Stcklin R, Menin L, 2004. Anti-microbial peptides: From invertebrates to vertebrates. *Immunological Reviews*, 198: 169 - 184.

Butt TR, Edavettal SC, Hall JP, Mattern MR, 2005. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr. Purif.*, 43: 1 - 9.

Cabral KMS, Almeida MS, Valente AP, Almeida FCL, Kurtenbach E, 2003. Production of the active antifungal *Pisum sativum* defensin 1 (Psd1) in *Pichia pastoris*: Overcoming the inefficiency of the STE13 protease. *Protein Expr. Purif.*, 31: 115 - 122.

Chen HX, Hu TS, Wang X, Qu XM, 2001. Cloning and fusion expression of antibacterial protein diptericin gene in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 17(2): 182 - 184. [陈海旭, 胡泰山, 王新, 屈贤铭, 2001. 抗菌肽 Diptericin cDNA 的克隆及在 *E. coli* 中的融合表达. 中国生物化学与分子生物学报, 17(2): 182 - 184]

Chen HX, Zou GY, Qu XM, 2002. Cloning and expression of antibacterial peptide magainin in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecula Biology*, 18(4): 461 - 464. [陈海旭, 邹冠玉, 屈贤铭, 2002. 抗菌肽 *magainin* 基因的克隆及其在 *Pichia pastoris* 中的表达. 中国生物化学与分子生物学报, 18(4): 461 - 464]

Fehlhaum P, Bulet P, Chernydsh S, Briand JP, Roussel JP, Letellier L, Hetru C, Hoffmann JA, 1996. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 1 221 - 1 225.

Gellissen G, 2000. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54: 741 - 750.

Hultmark D, Steiner H, Rasmmuson T, Boman HG, 1980. Insect immunity: Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupa of *Hyalophora cecropina*. *Eur. J. Biochem.*, 106: 7 - 16.

Jin FL, Xu XX, Wang LX, Zhang WQ, Gu DX, 2006a. Expression of recombinant hybrid peptide cecropinA (1 - 8)-magainin2 (1 - 12) in *Pichia pastoris*: Purification and characterization. *Protein Expr. Purif.*, 50(2): 147 - 156.

Jin FL, Xu XX, Zhang WQ, Gu DX, 2006b. Expression and characterization of a housefly cecropin gene in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, 49(1): 39 - 46.

Jin FL, Xu XX, Zhao SW, Zhang WQ, Gu DX, 2006. Cloning and expression of a *Musca domestica* defensin gene in *Pichia pastoris*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 45(3): 86 - 89. [金丰良, 许小霞, 赵仕炜, 古德祥, 张文庆, 2006. 家蝇防御素 defensin cDNA 的克隆及在毕赤酵母中的表达. 中山大学学报(自然科学版), 45(3): 86 - 89]

Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T, 1993. Defensins: Antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 11: 105 - 128.

Qian K, Lü ZB, Wen LZ, Shen ZL, 2005. Expression of thanatin in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of China Pharmaceutical University*, 36(3): 276 - 278. [钱坤, 吕正兵, 文良柱, 沈子龙, 2005. 死亡素在裂殖酵母中的表达. 中国药科大学学报, 36(3): 276 - 278]

Sambrook KJ, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sang YX, Deng XJ, Yang WY, Wang WX, Wen SY, Liu WQ, Huang YD, Cao Y, 2007. Secretive expression of insect antifungal peptide-encoded genes in *Pichia pastoris* and activity assay of the products. *Agricultural Sciences in China*, 6(10): 1 209 - 1 216.

Sun C, Chen XZ, Huan LD, Peng XX, 2001. Fusion expression of a peptide antibiotic-apidaecin gene in *Lactococcus lactis*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 17(1): 20 - 23. [孙超, 陈秀珠, 还连栋, 彭学贤, 2001. 多肽抗生素 *apidaecin* 基因在乳酸乳球菌中的融合表达. 生物工程学报, 17(1): 20 - 23]

Wang XF, Liu RH, Chen XY, Gao ZM, Chen JQ, 2007. Construction of vectors for expression of cleavable tandem repeat Thanatin fusion protein in plants. *Hereditas*, 29(6): 758 - 764. [汪小福, 刘仁虎, 陈笑芸, 高智谋, 陈锦清, 2007. 可剪切多拷贝抗菌肽融合表达载体的构建. 遗传, 29(6): 758 - 764]

Wen LZ, Zhang JL, Qian K, Gu L, Xu HM, Shen ZL, 2006. Fusion expressing of melitin and thanantin heteropeptide (MT) in *E. coli*. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 25 (6): 45 - 48. [文良柱, 张家骊, 钱坤, 顾林, 徐寒梅, 沈子龙, 2006. 蜂毒肽与死亡素杂合肽在大肠杆菌中融合表达的研究. 食品与生物技术学

报, 25 (6): 45 –48]

Weng HB, Niu BL, Meng ZQ, Xu MK, 2002. Cloning and expression of the cecropinB-thanatin hybrid antimicrobial peptide in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 18 (3): 352 –355. [翁宏飚,牛宝龙,孟智启,徐孟奎,2002. 家蚕抗菌肽-死亡素杂合肽基因在大肠杆菌中的克隆与表达. 生物工程学报, 18 (3): 352 –355]

Weng HB, Niu BL, Meng ZQ, Xu MK, 2003. Cloning and fusion expression of the antimicrobial peptide thanatin gene in *Escherichia coli*. *Acta Entomologica Sinica*, 46 (1): 114 – 117. [翁宏飚,牛宝龙,孟智启,徐孟奎,2003. 死亡肽基因的合成及在大肠杆菌中的表达. 昆虫学报,46 (1): 114 –117]

Wu GQ, Li LX, Ding JX, Wen LZ, Shen ZL, 2008. High-level expression and novel purification strategy of recombinant thanatin analog in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.*, 57(2): 95 –101.

Xu XX, Jin FL, Yu XQ, Ren SX, Zhang WQ, 2007. High-level expression of the recombinant hybrid peptide cecropinA (1 – 8)-magainin2(1 – 12) with an ubiquitin fusion partner in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.*, 55: 175 –182.

(责任编辑: 邓艳)